

## Continuous monitoring of an aerobic environmental biotechnology process using a flow system comprises using microorganisms from the process itself

**Publication number:** DE19917955

**Publication date:** 2000-10-26

**Inventor:** LEIFHEIT MATTHIAS (DE); MOHR KARL-HEINZ (DE)

**Applicant:** M & K BIO UND UMWELTECHNOLOGI (DE)

**Classification:**

- **International:** C02F3/00; C12M1/34; C12M1/36; C12Q1/04; G01N33/18; C02F3/00; C12M1/34; C12M1/36; C12Q1/04; G01N33/18; (IPC1-7): C12Q1/02; C12M1/34; C12M1/36; C12N11/02; G01N27/416

- **European:** C02F3/00R; C12M1/34; C12M1/36; C12Q1/04; G01N33/18A; G01N33/18F1

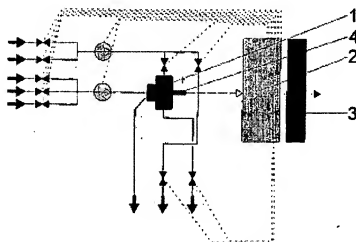
**Application number:** DE19991017955 19990421

**Priority number(s):** DE19991017955 19990421

**Report a data error here**

### Abstract of DE19917955

Process for monitoring aerobic environmental biotechnology processes, including laboratory studies, using a flow system comprises introducing microorganisms from the process being monitored into a measuring chamber, calibrating the microorganisms, passing a sample through the chamber and measuring any change in the state of the microorganisms. An Independent claim is also included for apparatus for carrying out the process, consisting of a flow system comprising a measuring chamber or two parallel measuring chambers, a control-analysis unit connected to a display device and pumps and valves.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

# Offenlegungsschrift DE 199 17 955 A 1

21 Aktenzeichen: 199 17 955.7  
22 Anmeldetag: 21. 4. 1999  
23 Offenlegungstag: 26. 10. 2000

51 Int. CL.7:  
C 12 Q 1/02  
C 12 N 11/02  
C 12 M 1/34  
C 12 M 1/36  
G 01 N 27/416

DE 199 17 955 A 1

- 11 Anmelder:  
M & K Bio- und Umwelttechnologie GmbH, 06132  
Halle, DE
- 14 Vertreter:  
Pauling, H., Dipl.-Wirts.-Ing.(FH)Pat.-Ing.Dipl.-Jur.,  
Pat.-Anw., 06108 Halle

- 12 Erfinder:  
Leifheit, Matthias, 06179 Teutschenthal, DE; Mohr,  
Karl-Heinz, Prof. Dr., 06122 Halle, DE

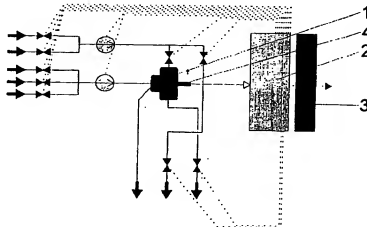
- 56 Entgegenhaltungen:  
DE 195 47 655 A1  
DE 295 13 115 U1
- Die kontinuierliche Kurzzeit-BSB-Messung  
(BSB-M3).  
Siepmann, F.W. Gewässerschutz, Wasser,  
Abwasser  
(1985) S. 233-256;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- 24 Verfahren und Vorrichtung zur Überwachung aerober umweltbiotechnologischer Prozesse

27 In der Umweltbiotechnologie werden Mikroorganismen mit speziellen Stoffwechselleistungen verwendet. Für einen störungsfreien Prozess ist eine laufende Überwachung erforderlich, die über das aktuelle Substratverwertungspotential der Mikroorganismen ständig informiert. Zur Gewinnung solcher Informationen ist die Bestimmung des biochemischen Sauerstoffbedarfes (BSB 5 gem. DIN 38409-H51) bekannt - jedoch zur laufenden Überwachung wenig geeignet. Auch bekannte Verfahren und Vorrichtungen zur BSB-Schnellbestimmung unter Verwendung definierter prozessfremder Mikroorganismen können dieses Problem nur bedingt lösen. Die erforderlichen Messeinrichtungen sind sehr aufwendig. Der Erfindung liegt deshalb das Problem zu Grunde, ein Verfahren zur aufwandsarmen Labor-BSB-Bestimmung und zur laufenden Überwachung aerober umweltbiologischer Prozesse und damit zur Steuerung dieser Prozesse zu entwickeln. Außerdem soll eine geeignete Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens geschaffen werden. Gemäß der Erfindung werden dazu in einem Fließsystem prozesseigene Mikroorganismen in eine Messkammer eingebracht, kalibriert, nachfolgend von Proben überströmt und Veränderung von Zustandsgrößen detektiert und ausgewertet. Die Mikroorganismen liegen in der Messkammer immobilisiert oder frei suspendiert vor. Die dazugehörige Vorrichtung besteht aus ein oder zwei Messkammern und einer Steuer- und Auswerteeinheit. In den Messkammern sind Signalgeber in räumlich enger Kopplung zu den ...



DE 199 17 955 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Überwachung aerober umweltbiotechnologischer Prozesse einschließlich Laboruntersuchungen sowie eine zur Durchführung dieses Verfahrens geeignete Vorrichtung.

In der Umwelt- und Produktbiotechnologie werden Mikroorganismen mit speziellen Stoffwechselleistungen verwendet. Für einen störungsfreien Prozess ist eine laufende Überwachung erforderlich, die über das aktuelle Substratverwertungspotential der Mikroorganismen ständig informiert.

Es hat dazu bisher nicht an Versuchen und Methoden gefehlt, solche Informationen zu ermöglichen.

- So ist aus dem Stand der Technik die Anwendung der Fließinjektionsanalyse (Flow Injection Analysis, FIA) bekannt. Dabei wird in einem Fließsystem eine Probe injiziert und über eine Reaktionsstrecke einem Detektor zur Ermittlung von Konzentrationsveränderungen und anderen Messwertänderungen zugeführt. Bisher ist jedoch die Anwendung der FIA auf typische produktbiologische Zwecke und wenige Zustandsgrößen wie z. B. Temperatur, pH-Wert beschränkt (Schüler: "Analytische Methoden in der Biotechnologie", Vieweg 1991).

- Weiterhin ist aus der Umweltbiotechnologie die Bestimmung des biochemischen Sauerstoffbedarf zum Feststellen von Abwasserverschmutzungen bekannt.

Dazu wird die für den Abbau von organischen Materialien benötigte Sauerstoffmenge in 5 Tagen erfasst (BSB 5 gem. DIN 38409-H51).

- Diese weit verbreitete Methode ist jedoch sehr aufwendig und zur laufenden Kontrolle umweltbiotechnologischer Prozesse nur bedingt geeignet. Bekannt sind auch Verfahren und Vorrichtungen zur Schnellbestimmung des biochemischen Sauerstoffbedarfes (BSB), wie in DE 29 51 3115 U1, DE 43 14 981 C2 und DE 196 20 250 A1 beschrieben. Dabei werden jeweils definierte prozessfremde Mikroorganismen zugesetzt.

Ferner ist aus der DE 29 51 5965 U1 eine Durchflussmesszelle für Biosensoren bekannt, die jedoch eine komplizierte Messanordnung aufweist.

- Alle bekannten Methoden und Anordnungen ermöglichen jedoch kaum eine frühzeitige bzw. laufende Erkennung schnell wechselnder biospezifischer Prozesszustände.

Der Erfindung liegt deshalb das Problem zugrunde, ein Verfahren zur aufwandsarmen Labor-BSB-Bestimmung und zur laufenden Überwachung aerober umweltbiotechnologischer Prozesse und damit zur Steuerung dieser Prozesse zu entwickeln. Außerdem soll eine geeignete Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens geschaffen werden.

- Das Verfahren gem. der Erfindung löst dieses Problem mit den kennzeichnenden Merkmalen des Patentanspruches 1. Vorteilhafte Ausgestaltungen hiervon sind in den Patentansprüchen 2 bis 4 angegeben.

Danach werden in einem Fließsystem prozesseigene Mikroorganismen in eine Messkammer eingebracht, kalibriert, nachfolgend von Proben überströmt und Veränderungen von Zustandsgrößen detektiert und ausgewertet.

Während des Messvorganges liegen dabei die prozesseigenen Mikroorganismen in der Messkammer gem. Patentanspruch 2 immobilisiert oder frei suspendiert gem. Patentanspruch 3 vor.

- Vorteilhafterweise erfolgt nach Beendigung des Messvorganges gem. Patentanspruch 4 eine automatische Reinigung der Messkammer.

Die zur Durchführung des Verfahrens geschaffene Vorrichtung ist durch die Merkmale des Patentanspruches 5 gekennzeichnet.

Zweckmäßige Ausgestaltungen der Vorrichtung sind in den Patentansprüchen 6 bis 9 angegeben.

- Danach besteht die Vorrichtung aus einem Fließsystem mit einer Messkammer 1; einer Steuer- und Auswertereinheit 2 – verbunden mit einer Anzeigeeinheit 3 – sowie Pumpen und Absperrrichtungen.

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform nach Patentanspruch 6 besteht die Vorrichtung aus einem Fließsystem mit zwei parallel angeordneten Messkammern 1,1 und 1,2; einer Steuer- und Auswertereinheit 2 – verbunden mit einer Anzeigeeinheit 3 – sowie Pumpen und Absperrrichtungen.

- Gem. Patentanspruch 7 sind in der Messkammer bzw. in den Messkammern Signalgeber 4 in räumlich enger Kopplung zu den prozesseigenen Mikroorganismen angeordnet.

Als Signalgeber werden vorzugsweise gem. Patentanspruch 8 Sauerstoff-Elektroden verwendet.

Weiterhin enthalten die Messkammern gem. Patentanspruch 9 vorzugsweise eine semipermeable Membran mit einem Porendurchmesser unter 10 µm.

- Das erfindungsgemäße Verfahren, unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist den entscheidenden Vorteil auf, die prozesseigenen Mikroorganismen als sensitive Komponente zu nutzen und damit auf die Verwendung zusätzlicher, fremder Mikroorganismen zu verzichten. Damit erzielte Kontrolluntersuchungen bestätigen den überraschenden Vorteil dieser Methode. Die Erfindung ermöglicht ein laufendes Überwachen aerober umweltbiotechnologischer Prozesse einschließlich Labor-BSB-Untersuchungen und damit Steuerungsmöglichkeiten.

- Mit der Ausführungsform von zwei Messkammern ist eine vorteilhafte Erhöhung der Messfrequenz verbunden. Die Erfindung wird im folgenden anhand der beigefügten Zeichnungen und Anwendungsbeispiele näher erläutert.

Es zeigen,

Fig. 1 eine Ausführungsform des Fließsystems gem. Patentanspruch 5,

Fig. 2 eine weitere Ausführungsform gem. Patentanspruch 6,

- Fig. 3 resultierende Mess-Signale in allgemeiner Form.

Das Fließsystem weist eine Messkammer 1 oder als Variante zwei parallel angeordnete Messkammern 1,1 und 1,2 auf, welche Signalgeber 4 enthalten, eine Steuer- und Auswertereinheit 2 verbunden mit einer Anzeigeeinheit 3 sowie übliche Pumpen und Absperrrichtungen. Als Pumpen dienen vorzugsweise Peristaltikpumpen und für die Absperrrichtungen bevorzugt Schlauchquetschventile.

- In der Messkammer 1 oder den Messkammern 1,1 und 1,2 läuft der eigentliche Messvorgang bzw. Messzyklus ab. Als Signalgeber 4 werden bevorzugt Sauerstoff-Elektroden eingesetzt, die sich in den Messkammern in unmittelbarer Nähe der Mikroorganismen befinden.

Zu Beginn der Messung wird suspendierte Biomasse mit den zu charakterisierenden Mikroorganismen zu den Mess-

kammern gefördert.

Die Biomasse kann während der Messung als Suspension in den Messkammern vorliegen oder sie wird an einer semipermieablen Membran, vorzugsweise einer Kernspinnenmembran mit Porendurchmessern unter 10 µm immobilisiert.

Anschließend wird eine sauerstoffhaltige Trägerflüssigkeit (Carrier), vorzugsweise eine Pufferlösung, zu den Messkammern gefördert. Mittels der Signalgeber 4 werden nun Signale über die Steuer- und Auswertereinheit erfasst und eine Grundlinie wird eingestellt.

Zu diskreten Zeitpunkten werden weiterhin die in den Messkammern befindlichen Mikroorganismen mit einem definierten BSB-Standard zur Kalibrierung kurzzeitig beprobt, welches messbare Stoffwechselreaktionen bewirkt. Die aus den Stoffwechselreaktionen resultierenden Signale werden detektiert und ausgewertet. In Fig. 3 ist ein Messablauf unter Verwendung von Sauerstoff-Elektroden als Signalgeber dargestellt.

Der Abschnitt I zeigt dabei die resultierenden Signale auf zwei aufeinanderfolgende Standardbeprobungen während der Kalibrierung.

Anschließend werden die in den Messkammern befindlichen Mikroorganismen für dieselbe Dauer mit dem Analyten beprobt. Dies stellt die Messphase dar. Der BSB-Wert wird ermittelt, indem die Signale auf die Beprobung mit Analyt mit denen aus der Kalibrierungsphase verglichen werden. Alle Messsignale werden in der Steuer- und Auswertereinheit erfasst, mathematisch aufgearbeitet und ein BSB-Wert als Messergebnis errechnet, welcher die Verwertung des Analyten durch die eingesetzten Mikroorganismen gegenüber der Verwertung des Standards durch dieselben angibt.

#### Anwendungsbeispiel 1

Die Laborbestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfes (BSB) erfolgt nach DIN 38 409. H51 üblicherweise innerhalb von 5 Tagen. In dieser Zeit wird der Sauerstoffverbrauch von Mikroorganismen durch die Oxidation organischer Verbindungen in Proben mit verschiedenen Verdünnungsstufen unter definierten Bedingungen ermittelt. Zu der eingesetzten Art der Mikroorganismen gibt es keine Festlegungen. Die Analyse dient meist dazu, Abwässer hinsichtlich ihrer Abbaubarkeit in biologischen Abwasserreinigungsanlagen einzuschätzen.

Aufgrund der langen Analysendauer und des hohen Geräte- und Personalaufwandes, der auftretenden Fehler, aber auch bezüglich der geringen Vergleichbarkeit zu den eigentlichen Abläufen in biologischen Prozessen, ist diese Methode nur bedingt aussagekräftig.

Die Erfindung wird genutzt, um im Labor in kurzer Zeit BSB-Werte von Abwässern zu bestimmen.

Als Mikroorganismen kommt eine Mischpopulation aus Flussschwebstoffen zum Einsatz, welche in der Messkammer immobilisiert wird. Als Carrier dient Kalium-Phosphatpuffer mit dem pH-Wert 7,0, einer Pufferkonzentration von 10 mM, einer konstanten Temperatur von 24°C und einem korrespondierendem Sauerstoffgehalt bei Normaldruck von 8,41 mg/l. Mit dem Carrier wird die Messkammer überströmt. Es erfolgt eine sequentielle Beprobung der Mikroorganismen in der Messkammer mit einem BSB-Standard mit Komponenten Glukose, L-Glutaminsäure und Harnstoff in definierter Zusammensetzung. In der Beprobungsfolge wurde dieser Standard 5 mal mit verschiedenen Kontaktzeiten beprobt. Dieser Vorgang entspricht der Kalibrierung (Phase I). Nachfolgend werden die Mikroorganismen in der Messkammer mit Abwasser definierter Zusammensetzung und bekanntem, rechnerisch ermittelten BSB-Wert, in der gleichen Weise wie in Phase I beprobt. Dies stellt die Messphase dar (Phase II).

Während des gesamten Messablaufes wird die Atmungsaktivität der Mikroorganismen in der Messkammer erfasst und ausgewertet. Nach erfolgter Messung wird die Messkammer gespült und mit neuen Mikroorganismen bestückt. Die für weitere Messungen eingesetzten Abwässer enthalten verschiedene BSB-Konzentrationen, welche durch die Erfindung bestimmt wurden.

Die Ergebnisse einer Messreihe sind aus der Tabelle 1 zu entnehmen. In Spalte 1 sind dabei die mit der erfindungsgeübten Vorrichtung ermittelten Messwerte zusammengefasst und den in Spalte 2 rechnerisch (aus der genauen Abwasseranalyse resultierend) ermittelten Werten gegenübergestellt. In Spalte 3 ist der relative Fehler in Prozent angegeben.

Eine Messung gem. der Erfindung dauerte 35 Minuten. Dies ergibt eine wesentliche Zeitersparnis gegenüber der üblichen Methode.

#### Anwendungsbeispiel 2

In biologischen Stufen industrieller Abwasserreinigungsanlagen ist es häufig notwendig und ökonomisch sinnvoll, in Abhängigkeit der oxidierbaren Abwasserfracht Nährstoffe genau zu dosieren. Dazu muß der Anteil biologisch verwertbarer Inhaltsstoffe im Abwasser kontinuierlich gemessen werden.

Mit der Erfindung wird periodisch alle 45 Minuten automatisch der BSB im Zulauf einer biologischen Stufe einer Industriell-Abwasserreinigungsanlage detektiert.

Zu diesem Zweck werden automatisch Mikroorganismen aus der Belebungsstufe der Abwasserreinigungsanlage entnommen und in einer Messkammer immobilisiert. Als Carrier dient Leitungswasser mit einer Temperatur von 30°C und einem korrespondierenden Gelöstsauerstoffgehalt bei 1 bar von 7,55 mg/l.

In der Folge erfolgte eine Kalibrierung (Phase I) mit einem BSB-Standard analog Anwendungsbeispiel 1. Danach werden die Mikroorganismen in der Messkammer mit aktuellen Abwasserproben aus dem Zulauf der Abwasserreinigungsanlage analog Phase I beprobt (Phase II).

Messdatenaufnahme und Auswertung erfolgt analog Anwendungsbeispiel 1.

Die Ergebnisse einiger Messwerte sind aus der Tabelle 2 zu entnehmen. In Spalte 1 sind dabei die mit der Erfindung ermittelten Messwerte zusammengefasst und den in Spalte 2 nach DIN 38 409, Teil 51 ermittelten BSB<sub>5</sub>-Werten gegenübergestellt. In Spalte 3 ist zusätzlich der relative Fehler in Prozent angegeben.

Bei Anwendung der Variante mit zwei parallel angeordneten Messkammern ist eine Verdopplung der Probenfrequenzen von 1,33 Proben/h auf 2,67 Proben/h möglich.

Für die Messungen werden die prozesseigenen Mikroorganismen angewandt, wodurch die Nährstoffdosierung pro-

zess-spezifisch gesteuert werden kann.

Tabelle 1

Ergebnisse zum Beispiel 1

BSB-Meßwert (mit Erfindung)	Vorgegebener rechnerischer BSB	Rel.Fehler
18,9 mg/l	20 mg/l	5,50%
21,8 mg/l	25 mg/l	12,80%
64,2 mg/l	60 mg/l	7,00%
86,8 mg/l	80 mg/l	8,50%
123,3 mg/l	120 mg/l	2,80%
224,2 mg/l	220 mg/l	1,90%
561 mg/l	500 mg/l	12,20%
872,3 mg/l	800 mg/l	9,00%
1321,2 mg/l	1200 mg/l	10,10%
2074,7 mg/l	2000 mg/l	3,70%

Tabelle 2

Ergebnisse zum Beispiel 2

BSB-Meßwert (mit Erfindung)	BSB5 (nach DIN 38409 T.51)	Rel. Fehler
1273 mg/l	1095 mg/l	16,30%
1030 mg/l	1083 mg/l	4,90%
1049 mg/l	980 mg/l	7,00%
984 mg/l	915 mg/l	7,50%
1058 mg/l	1118 mg/l	5,40%

#### Patentansprüche

- Verfahren zur Überwachung aerober umweltbiotechnologischer Prozesse einschließlich Laboruntersuchungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß in einem Fließsystem prozesseigene Mikroorganismen in eine Messkammer eingebracht, kalibriert, nachfolgend von Proben überströmt und Veränderungen von Zustandsgrößen detektiert und ausgewertet werden.
- Verfahren gem. Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass während des Messvorganges die prozesseigenen Mikroorganismen in der Messkammer immobilisiert vorliegen.
- Verfahren gem. Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass während des Messvorganges die prozesseigenen Mikroorganismen in der Messkammer frei suspendiert vorliegen.
- Verfahren gem. Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass nach Beendigung des Messvorganges eine automatische Reinigung der Messkammer erfolgt.
- Vorrichtung zur Überwachung aerober umweltbiotechnologischer Prozesse einschließlich Laboruntersuchungen gem. Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung aus einem Fließsystem mit einer Messkammer 1; einer Steuer- und Auswerteeinheit 2 – verbunden mit einer Anzeigeeinheit 3 – sowie Pumpen und Absperrrichtungen besteht.
- Vorrichtung zur Überwachung aerober umweltbiotechnologischer Prozesse einschließlich Laboruntersuchungen gem. Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung aus einem Fließsystem mit zwei parallel angeordneten Messkammern 1,1 und 1,2; einer Steuer- und Auswerteeinheit 2 – verbunden mit einer Anzeigeeinheit 3 – sowie Pumpen und Absperrrichtungen besteht.
- Vorrichtung gem. den Ansprüchen 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Messkammern Signalgeber 4 in räumlich enger Kopplung zu den prozesseigenen Mikroorganismen enthalten.
- Vorrichtung gem. den Ansprüchen 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Signalgeber 4 vorzugsweise Sauerstoff-Elektroden sind.
- Vorrichtung gem. den Ansprüchen 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Messkammern vorzugsweise eine semipermeable Membran mit einem Porendurchmesser unter 10 µm enthalten.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

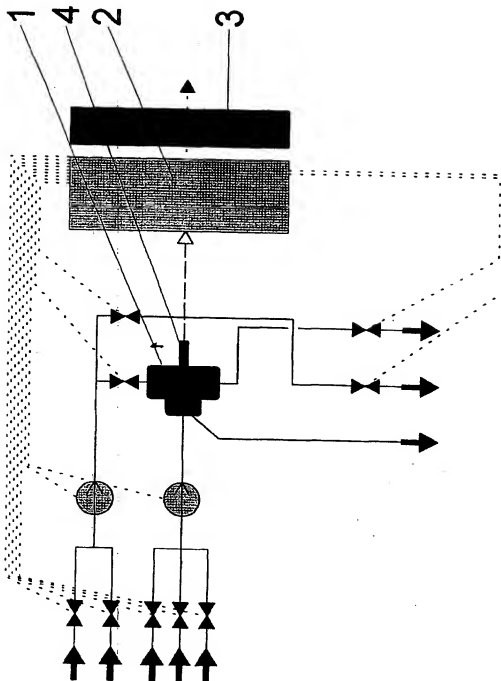


Fig.:1

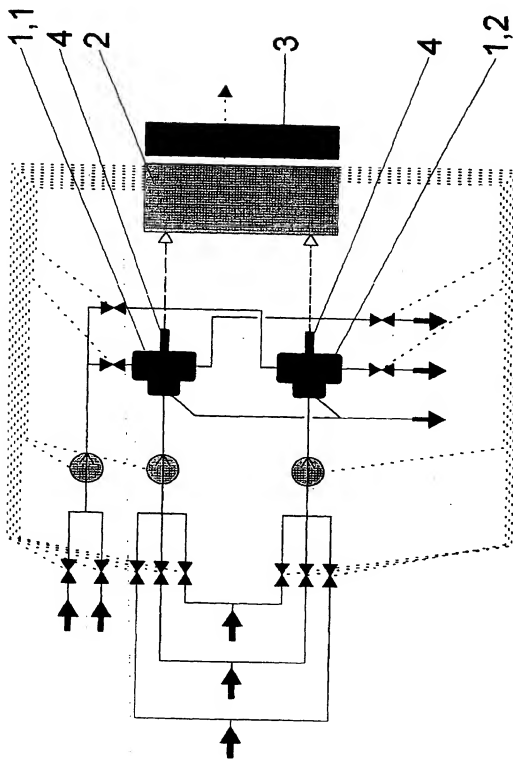


Fig.:2



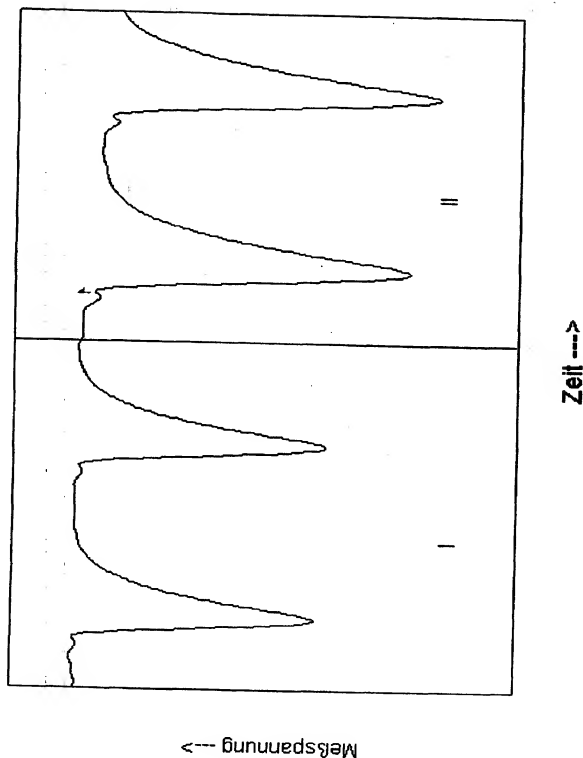


Fig.:3